

重要植物菌質體病害之診斷及鑑定- 梨衰弱病及翠菊黃萎病

劉秀玲¹、陳武揚¹、林長平^{1,2}

1. 國立台灣大學植物病理與微生物學系

2. 電子郵件：cplin@ntu.edu.tw；傳真：02-2366-1980

摘要

植物菌質體 (phytoplasma) 是一種重要之植物病原細菌，可造成花器葉片化 (phyllody)、萎凋、矮化 (stunting)、黃化及簇葉 (witches' broom) 等病徵。全球超過兩百種的植物病害是由植物菌質體引起，其中包括多種重要果樹及經濟作物，在農業上造成嚴重的損失。由於迄今仍無法對此類病原菌作純培養，故對其生理生化及生物特性的瞭解十分有限，因此也增加其在偵測上的困難。近年來因聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 之研發與應用，使得植物病害診斷及病原菌之偵測與鑑別更加快速靈敏。而在植物菌質體的研究上，PCR 技術則被普遍的應用於其偵測及親緣關係之鑑定。本研究室利用 PCR 技術針對自 1994 年始造成台中梨樹衰弱之病因進行探討，確定台灣梨衰弱病 (pear decline-Taiwan, PDTW) 係由親緣關係應歸屬於 apple proliferation group (16SrX group) 之臺灣梨衰弱病菌質體 (PDTW phytoplasma) 所引起。研究中亦進行台灣梨衰弱病之可能媒介昆蟲檢體內病原菌之偵測，本研究室分別於中國梨木蝨及黔梨木蝨中偵測到台灣梨衰弱病菌質體，並同時開發出快速靈敏之病原菌檢測技術如 booster PCR, multiplex PCR, nested PCR 與 RFLP-PCR 等，以供罹病梨株、媒介昆蟲及健康梨接穗病原菌偵檢之用，以完成病害防治策略之擬定及達致防疫檢疫之功效。本實驗室亦針對 2005 年於桃園縣大園鄉發生花器葉片化病徵之日日春病株進行病因鑑定，利用本研究室研發之植物菌質體廣用性引子對 f1/ r1 進行 PCR 偵檢，於疑病株中偵測到植物菌質體，後續並利用可增幅 16S rDNA 全長、16S-23S spacer sequence 及部分 23S rDNA 序列之 P1/ P7 引子對進行 PCR 反應，將該 PCR 片段經選殖、定序比對後，確定其核酸序列與造成翠菊黃萎病 (aster yellows) 之 16SrI group 之 phytoplasmas 具高度相同度。翠菊黃萎病菌質體寄主範圍極為廣泛，臺灣至今尚無此一病害發生之報告，為防範翠菊黃萎病入侵與蔓延，後續需針對發病地區周邊植物及昆蟲相，利用 PCR 進行全面偵檢工作，以避免其對我國之農業造成衝擊。

關鍵詞：翠菊黃萎病、聚合酵素連鎖反應、梨衰弱病、植物菌質體

緒 言

近年來，因巨分子分析工具及鑑定技術之研發成功，許多快速鑑定技術亦應運而生且被廣泛地應用於細菌及植物病原菌質體之鑑定及病害診斷之上，此等技術對無法或難以被培養之細菌的鑑定尤為重要。這些技術包括單元抗體、核酸探針之研製 (DNA probe) (Rasmussen and Reeves, 1992)，酵素聯結免疫吸附法 (ELISA)，組織轉印法 (tissue-printing)，核酸雜配法 (hybridization) 及聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 等之應用。其中許多研究報告乃利用由細菌基因庫 (genomic library) 中逢機選取所獲得之具特異性的核酸片段當作探針，應用於植物病原細菌之偵測與鑑定 (陳等, 1997; Chung *et al.*, 1994; Ko and Lin, 1994; Mizuno *et al.*, 1995)。此外，聚合酵素連鎖反應 (PCR) 也日益廣泛地被利用來鑑定和偵測植物病原細菌，近來更有許多研究報告以 16S-23S ribosomal DNA 區域中的 spacer region 及重複性序列片段如 insertion sequence (IS) 為目標 (target)，設計具特異性之 PCR 引子 (primer)，並在植物組織檢體中成功地偵測到植物病原細菌 (Maes *et al.*, 1996; Miyoshi *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 1999)。此等技術使得原本很難從事核酸探針選殖之病原細菌如維管束局限性 (vascular-limited) 之植物菌質體 (phytoplasma)、似細菌體 (bacteria-like organism)，或者如很難以生理生化特性區分之病原細菌各病理小種等，已能很有效率的完成具高敏感度及高專一性診斷技術之建立。

近年來本研究室致力於利用分生技術，研發具專一性之植物病原細菌之偵測與鑑定用核酸探針及 PCR 引子序列，並配合核酸雜配 (DNA hybridization) 和 PCR 等方法之運用，發展出快速、具高度靈敏性 (sensitivity) 和專一性 (specificity) 之病原細菌及植物菌質體檢測策略 (林與林, 1998; Chung *et al.*, 1994; Ko and Lin, 1994; Wu *et al.*, 1993)，期盼能將研究成果提供給檢、防疫單位及產業界以便防堵病菌入侵，預防病害發生，及協助產業界進行健康種苗篩選，進而提高作物生產品質，增加國際競爭力。

植物菌質體

植物菌質體 (phytoplasma)，原名似菌質體 (mycoplasma-like organism, MLO)，是一種重要的植物病原細菌，可造成罹病植株出現枝條增生 (proliferation)、花器葉片化 (phylloidy)、花瓣綠化 (virescence)、葉片變小 (rosette, little leaf)、萎凋 (wilt)、矮化 (dwarf, stunting)、黃化 (yellowing) 及簇葉 (witches' broom) 等病徵。目前全球已知有超過兩百種的植物病害是由植物菌質體所引起 (Agrios, 2005)，其中包括桃、梨等重要果樹及萵苣、花生、甘藷及泡桐等重要經

濟作物的病害，在農業上已造成十分可觀的損失。此病原菌最早是在 1967 年被發現，但由於迄今仍無法以人工方式對此病原菌作純培養，故對其生理生化及生物特性的瞭解仍屬有限 (Lim *et al.*, 1992; Sinha, 1980; Seemüller *et al.*, 1998)。植物菌質體病害屬系統性病害，可由昆蟲、種苗、嫁接等途徑傳播，而引起嚴重之損害。此類病害之防治對策，以採用不帶菌之健康種苗及防除媒介昆蟲為主，而此些防疫措施則完全仰賴正確及快速之診斷偵測技術之配合。目前面對農產品開放進口政策，植物檢疫、防疫工作日益重要，針對迄今仍無法培養之植物菌質體之檢測，亦唯獨有靈敏而快速之偵測方法方能有效達成檢疫、防疫目的。本研究室近年來已先後對本省之重要植物病原菌質體如水稻黃萎病、花生簇葉病及甘藷簇葉病等植物菌質體，除利用融合瘤技術 (hybridoma techniques) 研製單元抗體 (monoclonal antibodies) (Shen and Lin, 1993) 外，亦利用基因選殖技術，將植物病原菌質體基因體 DNA 中包括 rDNA 及 rDNA spacer (徐與林, 2002), insertion sequences (IS) 及 repeated sequences 等高重複性片段予以選殖、定序及序列分析，而開發出專一性及廣用性植物菌質體核酸探針及 PCR 引子 (林與林, 1998; 魏與林, 2004; Ko and Lin, 1994; Wu *et al.*, 1993)，並建立檢測技術。此類核酸探針及 PCR 引子，能有效偵檢出疑病植株及組織中之植物菌質體，如此除可於防疫工作上提供綜合防治策略之資訊外，亦可對開放進口之花卉、水果、糧作等各農、園藝植物及產品之檢疫提供有效之偵檢工具。

以聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 偵測植物菌質體

由於聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 的研發成功 (Saiki *et al.*, 1988)，使得植物病害診斷及病原菌之偵測與鑑定更為快速與靈敏。聚合酵素連鎖反應是在試管 (*in vitro*) 之狀況下，對一特定之標的 DNA (target DNA) 所進行之增幅反應，以期獲得大量之標的 DNA 片段以利分析。其主要反應步驟包括：(1) denaturation: 將模版 DNA 以高溫處理 (約 94°C)，使其互補雙股分離。(2) primer annealing: 降低反應溫度，使核苷酸引子能以氫鍵配對至模版 DNA 之相對位置上。(3) extension: 將溫度提升至反應中 DNA polymerase 進行催化反應時所需之溫度，使反應物中之 dNTPs 能依模版 DNA 之序列逐序添加於核苷酸引子之 3'-OH 上，完成 DNA 片段之合成。此三步驟合稱為一個循環，一般 PCR 反應多重複數十個循環，藉以獲得大量 PCR 產物，然而亦有些 PCR 操作將 PCR 循環中之 annealing 及 extension 二步驟合而為一。PCR 反應具備多項優點，使得此技術成為現今普遍用以偵測、診斷植物病害之方法。其中之優點包括：(1) 可用於不易培養之病原菌的偵測。(2) 因 target DNA 可經由多次 PCR 反應之後增幅至百萬倍，故靈敏度極高。(3) PCR 反應時所使用之核苷酸引子可決定反應結果之專一性，因此 PCR 技術可依所偵測目的之不同，設計出廣用性或專一性核苷酸引子。

近年來，在植物病理學的研究上，PCR 技術已廣泛地被應用於各種植物病原之偵測，在植物菌質體的研究上，則因為其尚不能被培養的特性，故學者亦多

採用 PCR 技術來偵測、鑑別或進一步探討植物菌質體之分類特性 (Smart *et al.*, 1996)。Firrao *et al.* (1993) 利用植物菌質體之 16S rDNA 核苷酸序列，合成引子對，用以偵測鑑定造成 apple proliferation 與 clover phyllody 之植物菌質體。Jomantiene *et al.* (1998) 亦藉由分析 16S rDNA 發現稀有植物 *Fragaria multicipita* 其實是受到植物菌質體感染而造成外部型態改變之 *F. chiloensis*。Staniulis *et al.* (2000) 亦藉此偵測發現，苜蓿會同時感染一種以上的植物菌質體。

台灣梨衰弱病(pear decline-Taiwan, PDTW)

在台灣梨樹病害之紀錄包括有梨赤星病 (pear rust, *Gymnosporangium haraeum*)、黑星病 (pear scab, *Fusarium pirium*) 等超過 24 種，但由植物菌質體所引起之梨衰弱病則尚無正式紀錄。從民國 83 年六月起，台灣中部東勢、和平兩地梨樹栽培區陸續發生台灣梨衰弱病 (pear decline-Taiwan, PDTW)，其病徵表現與國外發表之梨衰弱病 (pear decline) 極為相似，皆會引起罹病植株出現紅葉、衰弱萎凋等病徵，嚴重時造成植株死亡 (Chen *et al.*, 2001)。此一病害於東勢鎮與和平鄉交界處之大雪山林道 13 K 處約 17 公頃之果園首次被發現後，發病區域逐年向他處擴散，至今已渡過南勢溪進入新社鄉之白毛臺，初步推估約有 200 公頃之梨園受害。

台中縣東勢、和平交界處梨樹病變之病徵表現可區分為急性衰弱 (quick decline) 及慢性衰弱 (slow decline) 二型。急性衰弱型多發生於 10 年生以上之大植株，梨樹發病時全株葉片呈脫水狀，葉色變紅，快者經 3-4 個月死亡，慢者拖延至翌年死亡，根據調查在田間急性衰弱型約佔 2%，此類病株僅於此病害發生之早期 (1994 年) 發現，隨後因大量病株砍除而已不多見 (Chen *et al.*, 2001)；慢性衰弱型發病時通常於梨樹局部枝條的葉片開始呈現病變，然後向附近枝條擴散，葉片出現不正常紅葉現象，一開始由葉緣轉為赤紅色，逐漸向內延展終至全葉變為赤紅色，並容易於罹病株之葉片發現葉片尖端縊縮壞疽之現象，當植株發病嚴重時，整棵植株皆會出現嚴重紅葉病徵，故果農將此一病害稱之為「紅葉病」。在罹病地區肉眼可辨識之病變現象通常於二月下旬之花季開始出現，可以明顯觀察到罹病株之花朵較少，春季之新生葉生長不良、葉片明顯縮小，突長枝之增生亦明顯受阻，爾後並導致罹病植株之果實發育不良。上述急性與慢性衰弱型病徵與國外發表由植物菌質體引起之梨衰弱病相似，然而台灣梨衰弱病之紅葉病徵具兩側葉緣往向軸 (adaxial) 內捲約 30 度之現象，其與國外梨衰弱病發病初期葉片下半部先內捲，再逐漸由葉尖的方向往背軸 (abaxial) 外捲至 70 度形成向葉背呈鉤狀的徵狀具顯著差異 (Seemüller, 1992, Chen *et al.*, 2001)。

根據國外研究報告顯示梨衰弱病係經由對寄主植物 (梨樹) 具專一性 (host

specificity) 之同翅目梨木蝨 (*Cacopsylla* sp.) 進行媒介傳播。台灣目前已發現兩種梨木蝨，其中一種為 1994 年首次於和平鄉大雪山林道 13 公里處梨園發現的黔梨木蝨 (*C. qianli*) (Chou and Fang, 1994)，每年於 10 月至翌年 2 月間發生，成蟲及若蟲棲息於花穗部位危害，歷年來經農政單位共同防治，目前田間族群密度低不易捕獲。另一種為中國梨木蝨 (*C. chinensis*) 於 2002 年 8-9 月間在和平鄉崑崙山及新社鄉白毛台地區梨園首次發生，2003 年 4-5 月於東勢地區梨樹栽培區大發生，該年 5 月中旬於梨山佳陽開始發生且逐漸蔓延整個梨山地區約 2,000 公頃左右，造成幼果嚴重受害 (Yang *et al.*, 2004)。而此二種梨木蝨皆有可能扮演媒介昆蟲之角色，於田間傳播梨衰弱病。

台灣梨衰弱病菌質體之鑑定

本實驗室利用 PCR 技術針對台灣梨衰弱病罹病株進行植物菌質體之檢測，以進一步確定其病因。經採集台灣梨衰弱病罹病株之枝條，進行植物全 DNA 之抽取後，利用 Lee 等人 (1990) 依據翠菊黃萎病病原菌質體 (aster yellows phytoplasma) 之 Michigan 菌株 (MIAY 86-7) 的 16S rRNA 基因序列設計而來的植物菌質體專一性引子對 R₁₆F₂ (ACGACTGCTAAGACTGG) 與 R₁₆R₂ (TGACGGGCGGTGTGTACAAA CCCC)G)，及本實驗室所研發之植物菌質體專一性引子對，f1 (AGTGCGAACG GGTGAGTAA) 與 r1 (CGTCAGTAAAGACCCAGCAA) 引子對，針對台灣梨衰弱病罹病株全 DNA 進行 PCR 反應，實驗結果顯示可經由 PCR 反應偵測到病株內之植物菌質體之專一性片段，此一結果與本實驗室先前之初步分析相符 (Lin and Lin, 1998)。後續藉由所增幅之 PCR 產物選殖定序後以 NCBI 進行相似物種基因之搜尋，發現由罹病梨株中所增幅到之 PCR 產物，其 DNA 序列與引起梨衰弱病 (pear decline)、apple proliferation 及 European stone fruit yellows 等病害之植物菌質體之 16S rDNA 皆具有 98% 之相同度 (identity)，推斷台灣梨衰弱病亦是由植物菌質體 (PDTW phytoplasma) 所引起。隨後，進一步利用引子對 P1/P7 對台灣梨衰弱病菌質體所增幅之 16S rDNA 全長序列、16S-23S rDNA intergenic spacer region 序列及 23S rDNA 之 5' 端序列進行選殖及序列比對，顯示除 16S rDNA 與國外發表之 apple proliferation group (AP group, 16SrX group) 內引起梨衰弱病 (pear decline)、apple proliferation 及 European stone fruit yellows 等病害之各植物菌質體 strains 之 16S rDNA 全長序列具有 98.5% 以上之高度相同度外，在變異性較大之 16S-23S rDNA intergenic spacer region，亦與 apple proliferation group 上述之各植物菌質體 strains 之同一區域之序列具有 95.2% 以上的相同度，由此分子證據可更加確定危害台灣中部地區梨樹之植物病原菌質體與國外造成桃、梨及蘋果等果樹病害之植物菌質體相似性極高，應同屬於 group 16SrX 中之不同 subgroup (unpublished data)。

台灣梨衰弱病菌質體聚合酵素連鎖反應檢測技術之研發

由於台灣梨衰弱病菌質體引起之梨樹病害可藉由人為嫁接行為進行傳播，故非疫區之健康梨接穗之篩檢乃此病害之首要防疫工作項目。依據本研究所得之台灣梨衰弱病菌質體 rDNA 序列，本實驗室亦陸續完成台灣梨衰弱病菌專一性引子對 fPD1/ rPDS1 (1.4 kb), Apf1/ rPDS1 (790 bp) 及 Apf2/ L1n (963 bp) 之設計，並配合各引子對之設計亦進行了一系列快速靈敏之病原菌質體 PCR 檢測技術策略之擬定。其中包括 booster PCR, multiplex PCR, nested PCR 及 RFLP-PCR 等，並已應用於健康梨接穗之篩檢實驗及田間可能媒介昆蟲種類之探討。經由實驗結果評估發現，引子對 fPD1/ rPDS1 產物較大 (1.4 kb)，其 PCR 反應時間所需較長，但若結合 RFLP-PCR 之策略，則可有效的用於鑑定梨衰弱病菌質體，有利於健康梨接穗之檢測，然而其較不適用於罹病植株之病原菌長期監測實驗，也不易偵檢出攜菌量較低之媒介昆蟲。而 Apf1/ rPDS1 雖可利用在罹病植株中病原菌之檢測，但於媒介昆蟲之偵檢卻會受到非專一性 PCR 產物之干擾。實驗結果顯示利用台灣梨衰弱病菌質體專一性引子對 Apf2/ L1n 進行 booster PCR 可獲得最佳之檢測結果，其優點為相對 multiplex PCR 與 nested PCR 需二引子對配合，booster PCR 只需單一對核酸引子即可完成全程檢測實驗，且此一引子對含蓋變異性高之 16S-23S rDNA intergenic spacer region 序列，故具有較佳專一性，可同時避免梨樹全 DNA 與媒介昆蟲體內共生菌非專一性 PCR 產物之干擾，故推薦採用此一引子對配合 booster PCR 進行罹病植株及媒介昆蟲中台灣梨衰弱病菌質體之偵測。研究中即利用上述之 booster PCR 之檢測方法，分別於中國梨木蝨及黔梨木蝨檢體中偵測到台灣梨衰弱病菌質體之 rDNA 專一性片段，進一步經由 PCR 產物選殖定序後，證實此二梨木蝨檢體中皆攜帶有台灣梨衰弱病菌質體。而相關可能媒介昆蟲之傳菌實驗，則正由本研究室配合農業試驗所積極進行中。

翠菊黃萎病 (aster yellows)

翠菊黃萎病 (aster yellows, AY) 係指 aster yellows phytoplasma group (AY group, 16SrI group) 中 16SrI-A 及 16SrI-B 二亞群之 phytoplasmas (AY phytoplasma) 感染植物後所造成之病害，其寄主範圍相當廣泛，如：花卉（翠菊、日日春、仙客來、飛燕草）、蔬菜（番茄、甘藍、芹菜、萵苣）、水果（梨）、樹木（柳樹）及野草（馬齒莧）等都是此病原菌的寄主。早期研究此類病害之學者藉由其病徵及寄主而將 AY group 之 phytoplasmas 分成 103 個 strains，近來由於分子生物學的發展，目前學者利用分子生物學的證據將 AY group 細分為十五個亞群 (subgroup)，其成員之地理分佈幾乎遍及全世界，是一相當重要的植物病害 (Seemüller *et al.*, 1998)。翠菊黃萎病菌質體可藉由芽接、嫁接及數種媒介

昆蟲（葉蟬）來傳播，植物罹病後生長及發育異常，推測與其影響植物賀爾蒙之平衡具有相關性。罹病植物典型的病徵為：枝條增生 (proliferation)、矮化 (dwarf, stunting)、葉片畸形及變小 (little leaf)、黃化 (yellowing) 及簇葉 (witches' broom)、髮根 (hairly root)、花瓣綠化 (virescence)、不孕花 (sterility flowers)、果實畸形及不發育等，而導致品質不良及產量減少，嚴重影響商品價值 (Agrios, 2005)。

台灣疑似翠菊黃萎病之偵測研究

過去對於翠菊黃萎病菌質體之檢疫，大多直接藉由病徵觀察及顯微鏡技術等加以證實，在精確度、靈敏度及時效上已不敷需求；然而近來由於分子生物學的發達，許多學者們紛紛利用 PCR 技術來進行偵測植株中翠菊黃萎病菌質體的存在，如 Lee 等學者在 1993 及 1994 年的研究報告中曾發表之植物菌質體廣用性引子對 R16F2/ R2 及 16S rDNA group I 之專一性引子對 R16(I)F1/ R(I)1；1998 年 Lin and Lin 所發表之植物菌質體廣用性引子對 f1/ r1；這些研究報告之發表對翠菊黃萎病菌質體提供相當有效之偵測工作。其中本研究室所研發之植物菌質體 PCR 引子對 f1/ r1，其 PCR 反應時間所需較短（約 1 小時），增幅之 DNA 片段約 650 bp，其大小除方便於即時進行 phytoplasma 之偵檢外，亦極適合進行基因之選殖定序分析，以初步確認 phytoplasma 所屬之 group，是目前檢體檢測中極為有效之診斷、鑑定工具。

2005 年於桃園縣大園鄉花農所栽培之菊花及日日春分別發生菊花黃化及日日春花器葉片化及綠化病徵，由於黃化與花器葉片化及綠化等病徵屬於植物菌質體病害所特有之病徵，故本研究室即針對可能造成該等病害之病因進行探討。當時即利用本研究室所研發之植物菌質體廣用性引子對 f1/ r1 進行 PCR 偵檢，結果顯示於發病之菊花及日日春植株中可偵測到植物菌質體專一性 PCR 產物，經由進一步選殖定序後，經由 NCBI 比對發現其與造成翠菊黃萎病 (aster yellows) 之 16SrI group 之植物菌質體具高度相同度。後續再利用可增幅植物菌質體 16S rDNA 序列全長、16S-23S spacer sequence 及部分 23S rDNA 序列之 P1/ P7 引子對進行 PCR 反應，經選殖定序比對後，亦發現其與 16SrI group 之植物菌質體具高度相同度，其應為 AY phytoplasma。翠菊黃萎病菌質體寄主範圍極為廣泛，一旦侵入台灣必造成作物重大損失，為防範翠菊黃萎病可能之入侵及蔓延，後續需針對該病害發病區周邊植物及昆蟲相，利用 PCR 進行全面偵檢工作，防範翠菊黃萎病之入侵與蔓延，避免對我國之農業造成衝擊。

結 論

在東勢、和平地區所發生之台灣梨衰弱病罹病株中，經實驗證實確有植物菌質體之感染，此一結果與年前之初步分析相符（林與林，1998），此次實驗中則進一步進行基因序列分析，其結果顯示此一植物菌質體與造成桃、梨與蘋果等果樹病害之植物菌質體同屬於 apple proliferation group。後續實驗將深入探討植物菌質體之發病生態，並配合其他實驗如 1. 電子顯微鏡觀察：進行罹病株組織切片植物菌質體細胞之觀察。2. 嫁接實驗。3. 媒介昆蟲之確定：進行可能媒介昆蟲中國梨木蝨及黔梨木蝨之組織切片，利用電顯觀察昆蟲體內中可能含有植物菌質體之器官如中腸、唾腺等（Webb *et al.*, 1999），再配合咬食等實驗，進一步分析媒介昆蟲傳染之途徑及其對梨樹之危害性，並發展積極有效的防治策略。

而針對台灣初次之翠菊黃萎病發生報告，由於目前國內花卉栽植，部分採用國外進口之種苗作為繁殖材料，如菊花扦插苗等。而此類活植物苗之輸出國，如美國即為翠菊黃萎病菌質體之疫區，故極有可能藉由植物活體之輸入引進，造成此類病害的侵入，而國內迄今仍未針對此一病原菌質體提出檢防疫上之偵測技術與策略，本研究室目前已著手建立此一病原菌之偵檢技術，並將擬定其標準檢測流程及檢疫、防疫策略以防堵此一病原菌之入侵。於 2005 年經由檢疫策略之運作，本實驗室已成功地由菊花植株檢測出翠菊黃萎病，並即時予以銷毀，且將持續進行後續之監測工作。

引用文獻

- 林翠淳、林長平。1998。植物菌質體廣效性 PCR 引子之評估。植物病理會刊 7: 33-42。
- 徐仕美、林長平。2002。以 16S-23S rDNA spacer 核酸序列分析台灣植物菌質體之親緣關係。植物病理會刊 11: 199-206。
- 陳隆鐘、王志宏、謝式上半鈺。1997。台灣水稻白葉枯病菌專一性核酸探針之選殖與分析。植物保護學會會刊 39: 181-194。
- 魏慧珍、林長平。2004。以逢機定序方式選殖花生簇葉病菌質體之質體及插入序列。植物病理學會刊 13: 143-154。
- Agrios, G. N. 2005. Plant diseases caused by mollicutes: phytoplasmas and spiroplasmas. Pages 687-703 in: Plant pathology. 5th Ed. Academic Press, San Diego, CA..
- Chen, C. C., Leu, T. D., Lin, C. P., and Kuo, K. C. 2001. Comments on the disease that similar to pear decline in Taiwan. Plant Prot. Bull. 42: 1-5.
- Chou, L., and Fang, S. 1994. New record of *Psylla qianli* (Homoptera: Psyllidae) from Taiwan. J. Agric. Res. China 43: 467-468.
- Firrao, G., Gibbi, E., and Locci, R. 1993. Use of polymerase chain reaction to produce

- oligonucleotide probes for mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83: 602-607.
- Jomantiene, R., Davis, R. E., Dally, E. L., and Maas, J. L. 1998. The distinctive morphology of '*Fragaria multicipita*' is due to phytoplasma. *HortScience* 33(6): 1069-1072.
- Ko.H.C., and Lin,C.P. 1994. Development and application of cloned DNA probes for a mycoplasma-like organism associated with sweetpotato witches' broom. *Phytopathology* 84: 468-473.
- Lee, I. -M., Davis, R. E., and DeWitt, N. D. 1990. Non-radioactive screening method for isolation of disease-specific probes to diagnose plant diseases caused by mycoplasma-like organism. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1471-1475.
- Lee, I. M., Hammond, R.W., Davis, R.E., and Gundersen, D.E. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83: 834-842.
- Lee, I. M., Hammond, R.W., Davis, R.E., and Gundersen, D.E. 1994. Use of mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. *Phytopathology* 84: 559-566.
- Lim, P. O., Sears, B. B., and Klomparens, K. L. 1992. Membrane properties of a plant-pathogenic mycoplasma-like organism. *J. Bacteriol.* 174: 682-686.
- Maes, M., Garbeva, P., and Crepel, C. 1995. Direct PCR detection of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii*, the causal agent of bacterial leaf spot and stem rot on pelargonium. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gen.*, 60/ 2a: 271-275.
- Miyoshi, T., Sawada, H., Tachibana, Y., and Matsuda, I. 1998. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by PCR using primers from the spacer region between the 16S and 23S rRNA genes. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 64: 249-254.
- Mizuno, A., Tsushima, S., Kadota, I., and Nishiyama, K. 1995. A cloned DNA probe for detection of *Pseudomonas gladioli*. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 61: 22-26.
- Pan, Y.-B., Grisham, M. P., and Burner, D. M., Legendre, B. L., and Wei, Q. 1999. Development of polymerase chain reaction primers highly specific for *Xanthomonas albilineans*, the causal bacterium of sugarcane leaf scald disease. *Plant Dis.* 83: 218-222.
- Rasmussen, O. F. and Reeves, J. C. 1992. DNA probes for the detection of plant pathogenic bacteria. *J. Biotechnol.* 25: 203-220.
- Saiki, R.K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Seemüller, E. 1992. Pear decline. Pages 308-334 in: *Plant Diseases of International*

- Importance, Vol. 3. J. Kumar, H. S. Chaube, U. S. Singh, and A. N. Mukhopadhyay, eds. Prentice Hall. Eaglewood Cliffs, NJ.
- Seemüller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A., and Göschl, M. 1998. Current status of molecular classification of the phytoplasma. *J. Plant Pathol.* 80: 3-26.
- Shen, W. C., and Lin, C. P. 1993. Production of monoclonal antibodies against a mycoplasma-like organism associated with sweetpotato witches' broom. *Phytopathology* 83: 671-675.
- Sinha, R. C., and Madhosingh, C. 1980. Proteins of mycoplasma-like organisms purified from clover phyllody and aster yellows-affected plants. *Phytopath. Z.* 99: 294-300.
- Smart, C. D., Schneider, B., Blomquist, C. L., Guerra, L. J., Harrison, N. A., Ahrens U, Lorenz, K. H., Seemüller, E., and Kirkpatrick, B. C. 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2988-2993.
- Staniulis, J. B., Davis, R. E., Jomantiene, R., and Kalvelyte, A., Dally, E. L. 2000. Single and mixed phytoplasma infections in phyllody- and dwarf-disease clover plants in Lithuania. *Plant Dis.* 84(10): 1061-1066.
- Webb, D. R., Bonfiglioli, R. G., Osler, C. R., and Symons, R. H. 1999. Oligonucleotides as hybridization probes to localize phytoplasmas in host plants and vectors. *Phytopathology* 89: 894-901.
- Wu, F. Y., Lin, C. P., and Chen, C. C. 1993. Development of cloned DNA probes for a mycoplasma-like organism associated with rice yellow dwarf. *Plant Pathol. Bull.* 2: 140-149.
- Yang, M. -M., Huang, J. -H., and Li, F. 2004. A New Record of *Cacopsylla* Species (Hemiptera: Psyllidae) from Pear Orchards in Taiwan. *Formosan Entomologist.* 24: 213-220.

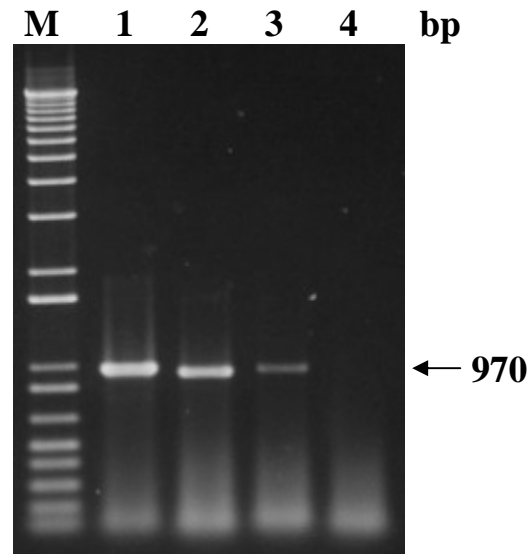
ABSTRACT

Liu, S. L.¹, Chen, W. Y.¹, and Lin, C. P.^{1,2} 2006. The detection and identification of phytoplasmas associated with pear decline and aster yellows. (¹Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University, Taipei, Taiwan 106, R.O.C.; ²Corresponding author, E-mail: cplin@ntu.edu.tw; Fax: +886-2-23661980)

Pear decline (PD) is an important pear disease caused by phytoplasma, which occurs mainly in Europe and North America. In 1994, pears exhibited a slow decline symptom were observed in orchards of central Taiwan. Universal primer pair, f1/ r1, which can specifically amplifies the conserved 16S rDNA fragment of phytoplasmas in the polymerase chain reaction (PCR), was used to amplify the phytoplasma-specific fragment with total DNA extracted from the diseased leaf samples. Sequence analysis of the 658 bp-PCR products revealed that the agent that cause PD-like disease in Taiwan (Pear Decline-Taiwan, PDTW) was closely related to the phytoplasmas of apple proliferation group that cause diseases on peach, pear, and apple. Primer pair P1/ P7 was then used to amplify a 1,784 bp fragment containing the full length of 16S rDNA, 16S-23S rDNA intergenic spacer region and partial 23S rDNA sequences of PDTW phytoplasma. Consistent with the result of 16S rDNA sequence analysis, sequences within the 16S-23S rDNA intergenic spacer region supported that the PDTW phytoplasma that cause PD-like disease in Taiwan is a new subgroup of the apple proliferation group. Based on the analysis of rDNA sequence of PDTW phytoplasma, two specific primer pairs APf2/ L1n and fPD1/ rPDS1 were designed in this study for the detection of the etiological agent in pear trees and insect vectors. Based on the sequence analyses of the PCR-amplified fragments, two species of pear psyllas *Cacopsylla qianli* (Yang and Li), and *Cacopsylla chinensis* (Yang and Li) were found to carry PDTW phytoplasma. Aster yellows (AY) phytoplasma has very broad host range, and has not been reported in Taiwan. Recently, virescence and phyllody of periwinkle was observed in an isolated farm in Dayuan Shiang, Taoyuan County. Diseased periwinkle was detected by PCR using f1/ r1 primers, and the sequence of the PCR-amplified fragment was identified to be the partial sequence of the 16S rDNA of phytoplasma. Primer pair P1/ P7 was then used to amplified a fragment containing the full length of 16SrDNA, 16S-23S rDNA intergenic spacer region and partial 23S rDNA sequence, and the sequence of the 16S rDNA of the phytoplasma shares a 99% identity with the sequences of the aster yellows (AY) group (16SrI) phytoplasmas. When scion from diseased periwinkle was grafted onto healthy periwinkle, symptom of virescence and phyllody can be observed

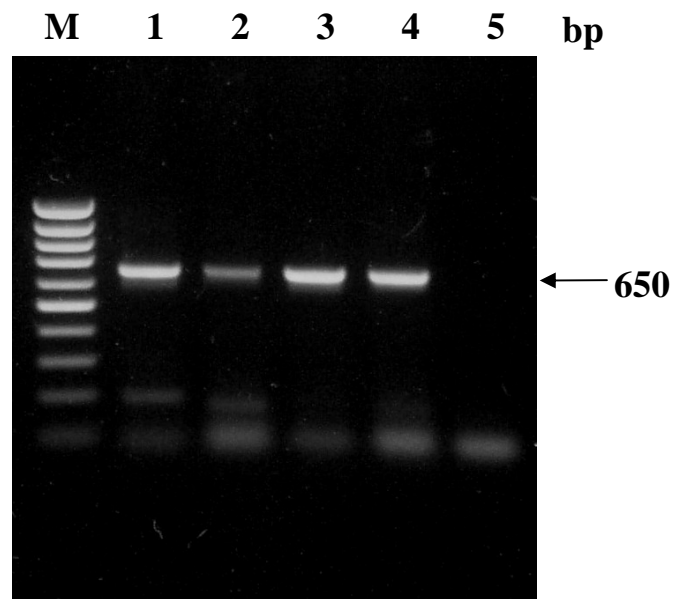
within 4-5 weeks. Phytoplasma can also be detected in grafted periwinkle using PCR with f1/ r1 primers. Samples including chrysanthemum, sage, periwinkle seeds and leaf hoppers were collected from the same horticultural farm and detected by PCR using f1/ r1 primers. Phytoplasma-specific-PCR product was amplified from diseased chrysanthemum. The sequences of the 16SrDNA of the phytoplasmas on periwinkle and chrysanthemum was found to be completely identical to each other. The infection of AY phytoplasma on periwinkle happened naturally, and the transmission pathway still needs to be further investigated.

Key words: aster yellows, PCR, pear decline, phytoplasma.



圖一、利用台灣梨衰弱病專一性引子對 Apf2/ L1n 進行梨樹罹病株及媒介昆蟲 PCR 檢測之結果。

Fig. 1. Polymerase chain reaction (PCR)-product amplified by using PDTW-specific primer pair Apf2/ L1n with the DNA templates extracted from: lane 1, PDTW-phytoplasma infected pear; lane 2, *Cacopsylla qianli*; lane 3, *C. chinensis*; lane 4, PnWB-phytoplasma infected periwinkle. M, 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen Corp., San Diego, CA) as molecular weight standards. Size (in bp) of PCR product is shown on the right.



圖二、利用植物菌質體廣用型引子對 f1/ r1 進行翠菊黃萎病罹病日日春 PCR 檢測之結果。

Fig. 2. Polymerase chain reaction (PCR)-product amplified by using universal primer pair f1/r1 with the DNA templates extracted from: lanes 1 and 3, AY phytoplasma-infected periwinkle; lanes 2 and 4, PnWB phytoplasma-infected periwinkle; lane 5, water control. M, 100 bp ladder. Size (in bp) of PCR product is shown on the left.